

代謝機能解析システム（購入年度：2009 年度）

物質生命理工学科 生体分子化学研究室 戸谷 希一郎

1. はじめに

生体内には核酸やタンパク質のほかに、糖質、有機酸、アミノ酸など多くの低分子が存在する。これらの多くは、酵素などの代謝活動によって作り出された代謝物質である。細胞の働きを包括的に理解しようとするとき、DNA配列の網羅的解析（ゲノム解析）やタンパク質の網羅的解析（プロテオーム解析）に加えて、代謝物質の網羅的解析（メタボローム解析）が重要であると言われている。たとえば、マイクロアレイ解析で変化が観察されても、表現型に最も近いメタボローム解析をしてみると変化が見られない事例が報告されている。また広い見地に立てばメタボローム研究の成果は、産業上の価値がある代謝産物を生産する代謝工学技術を確認するとも言える。

具体的なメタボローム研究としては、脂質、糖、アミノ酸、核酸関連物質などの代謝産物群の体系的あるいは網羅的解析、代謝産物情報に基づく細胞状態の評価・分類、細胞の代謝経路のモデル化とシミュレーション、代謝経路を制御する化合物の予測と設計、新機能を付与した細胞の作製などが挙げられる。今回、導入した装置は、疾患細胞などの評価指標となる代謝産物情報を体系的かつ大規模に解析するシステムであり、特定の細胞状態を規定する代謝産物の同定、新しい代謝過程の発見、代謝産物の変化情報に基づく細胞機能の解明と制御などの研究を強力に支えるものである。

2. 装置の構成

目標とする解析対象に対して、複数の特色ある分析機器を組み合わせることで、相乗効果が期待できる例は数多く知られている。たとえば液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせることで、研究者は混合物を定量的に分離後、直接、各ピークの物性を知ることができる。その高い有効性により、現在ではこれらを組み合わせた装置が多数販売されている。一方、代謝産物解析はいまだ黎明期にあり、これに特化した分析機器をパッケージとして販売している例は限られている。そこで今回の研究装置導入にあたり、複数の分析機器の解析結果をコンピュータによって連動させることとした。装置はふ

たつのユニットから構成されている。ひとつは日本モレキュラーデバイス社製 リキッドトランスファーシステム搭載マルチモードリーダーFlexStation3である。この装置はあらゆる測定モードに対応したハイスループットな光度計である。これを用いることによって、代謝産物量の測定や代謝産物生成酵素反応のアッセイ、代謝産物生成酵素量の測定や代謝産物とタンパク質の結合アッセイなどが可能となる。もう一方のユニットは、バイオラッド社製 リアルタイム PCR 解析システム CFX96 である。これは遺伝子増幅と遺伝子発現量の解析を行う装置であり、その特性を利用してタンパク質の相互作用解析に転用することもできる。これを活用すると代謝産物生成酵素の発現を遺伝子レベルで定量解析でき、また代謝産物とタンパク質の基質特異性解析が可能となる。



図1 5モードマルチプレートリーダー FlexStation3



図2 リアルタイム PCR システム CFX96

3. 装置の特性

FlexStation3 は多様なアプリケーションに応用可能な吸光、蛍光、発光、時間分解蛍光、蛍光偏光の5モードの測定が可能であり、分光計として優れた汎用性を備えている。また2基のモノクロメーターにより、アッセイに応じた励起、測定波長を1nm単位で任意に設定でき、測定精度が極めて高い。さらにサンプルを384穴プレートに注入して解析できるため、キュベットタイプの分光計と比較して多サンプルを少量(30 µL)で迅速に分析することが可能である。加えて、分注システムを内蔵しているのでセルベースの迅速なアッセイが可能である。

CFX96 は FAST PCR(最大温度制御速度 5.0℃/秒)により従来の PCR 装置と比較して高速化が可能であり、概ね30分以内に結果を得ることができる。また8段階の温度グラジェント機能を備えており、最適条件の設定が簡便である。さらに10µlのサンプル量から実験を行うことができ、貴重なサンプルを用いた少量実験に有効である。

4. 応用例

身体の特徴や疾患などは、生体内の多様な生命現象の結果として生ずる表現型であり、それらの表現型に直接影響を与える物質が代謝産物(糖質、脂質、抗生物質)である。本装置は代謝情報を核酸レベル、タンパク質レベル、代謝産物レベルで階層横断的に分析することができ、代謝情報による細胞状態の評価に威力を発揮する。

我々は生体内の糖タンパク質糖鎖が示す構造プロファイルに注目し、これを個々の細胞状態を示す代謝情報と捉え、糖鎖プロファイルによる疾患の評価・診断を試みている。新生タンパク質の多くは小胞体において糖鎖付加を受け、その糖鎖構造は酵素の働きによって多様な構造に変換される。それらの各構造(グリコフォーム)はタンパク質の成熟、選別、輸送、分解などを制御するタグとして利用されており、糖鎖によってタンパク質の品質管理が行われている。一方、何らかの内的・外的要因によってタンパク質の品質管理が破綻すると細胞内に不良タンパク質が蓄積し、ストレス状態に陥る。細胞はこれに対処するいくつかの方策を備えているが、これらによっても対処しきれない状態に陥ると、疾患を発症する。こうしたタンパク質合成不全によって引き起こされる疾患は、フォールディング病と呼ばれているが、アルツハイマーや糖尿病もこの種の疾患に含まれる。

このような疾患の理解を進めるにあたり、我々は糖鎖という代謝産物情報を始点として本装置による階層横断

的な解析を行っている。例えば5モードマルチプレートリーダー FlexStation3 は、代謝産物レベルからタンパク質レベルの解析に有効であり、これを用いて「糖鎖の定量」、「糖鎖プロセッシング反応の特異性解析」、「糖鎖プロセッシング酵素やレクチンの定量」、「糖鎖-レクチン相互作用解析」および「レクチン分布解析」を行っている。一方、リアルタイム PCR システム CFX96 は、タンパク質レベルから遺伝子レベルの解析に適しており、本装置によって「糖鎖-レクチン特異性解析」、「糖鎖関連タンパク質の遺伝子増幅」および「糖鎖関連タンパク質の遺伝子発現量比較」に取り組んでいる。

これらの分析結果を統合することで、フォールディング病における「糖鎖プロファイル」、それを生み出す糖鎖プロセッシング「酵素の活性発現状況」、さらに糖鎖プロセッシング酵素の設計図である「遺伝子の発現状況」を階層横断的に理解することができるようになりつつある。これまでフォールディング病を、このように包括的に理解しようと試みた例は報告されておらず、本装置の代謝機能解析への有効性に確信を深めている。

5. おわりに

我々は生命の表現型を、代謝産物を介して認識しており、その代謝情報を正しく理解することは、これからのライフサイエンスの命題である。本装置の活用によって我々は生命現象を代謝産物・タンパク質・遺伝子の各階層横断的に解析することが可能となった。今後、これを駆使して代謝情報としての糖鎖機能を正しく理解し、活用すべく、研究を進めていきたい。

最後に本装置は汎用性が高く、多サンプルに対して迅速な解析を行うことができるため、導入以来、ほぼ毎日稼働しており、既に多様な分析に対して多くの有用なデータが蓄積されている。我々は本装置によって得られたデータを用いて25th International Carbohydrate Symposiumにおいて3件の研究発表を行い、うち1件の成果は国際学術論文に投稿中である。